

ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТОРОВ ПЕКТИНМЕТИЛЭСТЕРАЗЫ ЛЮЦЕРНЫ НА КИНЕТИКУ ДЕЭТЕРИФИКАЦИИ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

А. Т. БЕЗУСОВ, Т. И. НИКИТЧИНА*

БКПиН, Одесская национальная академия пищевых технологий, Одесса, УКРАИНА

*email: nikitchinati@ukr.net

АННОТАЦИЯ Исследованы возможности регулирования ферментативной активности и использования пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны для деэтерификации яблочного пектина, с использованием моделирования ферментативной реакции в присутствии эффекторов. Проведена экспериментальная оценка представителей активаторов и ингибиторов пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны. Установлено влияние эффекторов путем изменения константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции в результате взаимодействия активаторов и ингибиторов пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны, как со свободной формой фермента, так и с фермент-субстратным комплексом.

Ключевые слова: пектиновые вещества, фермент, пектинметилэстераза, пирокатехин, ионы кальция, люцерна, скорость реакции.

INFLUENCE OF EFFECTORS PECTIN METHYLESTERASE ALFALFA DEESTERIFICATION KINETICS OF PECTIN SUBSTANCES

A. BEZUSOV, T. NIKITCHINA*

Odesa national academy of food technologies, Odesa, UKRAINE

ABSTRACT The modern technology of food production enzyme preparations with pectolytic activity were used in technological operations of clarification of juices, as well as in the production of juices with pulp, which makes them indispensable in the processing of berries, fruits and vegetables. In basis of their use in technologies ability of deesterification lies and to depolymerize a pectin. The resulting pectin methylesterase herbaceous crops - alfalfa, possible to obtain an environmentally friendly preparation. One of the most important features of pectin methylesterase alfalfa enzyme preparation is the presence in its composition two catalytically active sites that, despite the high degree of homology differ in substrate specificity, affinity for inhibitors capable of activating cations. Influence of effectors by modifying the Michaelis constant and maximum reaction velocity as a result of the interaction of activators and inhibitors of the enzyme pectin preparation alfalfa as with the free form of the enzyme and to the enzyme-substrate complex. Experiments have shown that the resistance to the natural inhibitors of the enzyme preparation exceeds the data of microbiological origin of "Pectofoetidin P20x", which allows to increase the technological properties of the plant enzyme. An important fact is also that the Ca^{2+} ions and pyrocatechol widely present in fruit and vegetable raw materials, so the study and characterization of their influence on the behavior of pectolytic enzyme preparation with selective functional features, allowing to get low esterified pectin, possessing both detoxifying and gelling properties, is the justification of the relevance research data. Thus, pectin methyl esterase enzyme alfalfa product most adapted to the biological system plant material, indicating that the high catalytic ability.

Keywords: pectin substances, enzymes, pectin methylesterase, pyrocatechol, ions of calcium, alfalfa, speed of reaction

Введение

В основе процессов, происходящих при изготовлении и хранении многих пищевых продуктов, лежат изменения, вызываемые деятельностью растительных ферментов, или ферментных препаратов и ферментов, выделяемых микроорганизмами. Особое место занимают пектолитические ферменты, активность которых наступает при механическом воздействии на растительное сырье. Наибольший интерес представляет пектинметилэстераза растительного сырья, позволяющая получать низкометоксилированный пектин, очень важный для создания группы продуктов функционального назначения.

Изучение механизма действия ферментного препарата с высокой пектинметилэстеразной активностью, полученный нами из люцерны поможет выявить процессы, протекающие в производстве различных пищевых продуктов, в первую очередь, в технологиях соковых производств. Химический состав плодов и овощей свидетельствует, что они содержат компоненты, способные участвовать в окислительно-восстановительных процессах и обладающие высоким потенциалом. Растительное сырье для пищевой промышленности имеет разнообразный химический состав, что может одновременно с ферментами, действующими на сырье, влиять на их каталитические функции [1, 2].

Важным свойством ферментов, которое необходимо учитывать при их практическом использовании в пищевой промышленности, является

© А. Т. БЕЗУСОВ, Т. И. НИКИТЧИНА, 2016

стабильность, то есть способность сохранять каталитическую активность. При хранении и, особенно в ходе ферментативной реакции, фермент может частично или полностью терять свою каталитическую активность и полностью инактивироваться. Одним из эффективных способов стабилизации ферментов является определение их конформационной и электростатической комплементарности между молекулами субстрата и фермента и уникальной структурой активного центра фермента, обеспечивающими высокое сродство и избирательность протекания химических реакций, осуществляющихся в перерабатываемой растительной ткани.

Для успешного применения ферментного препарата с высокой пектинметилэстеразной активностью, полученного нами из люцерны, важно определить условия проявления им максимальной активности в присутствии природных химических соединений сырья, которые могут влиять на скорость ферментативных реакций.

Цель работы

Целью работы стало исследование каталитических характеристик пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны, и, на основании полученных данных, определение механизма взаимодействия активных центров фермента с эффекторами, содержащимися в растительном сырье для получения стабильной кинетики деэтерификации пектиновых веществ.

Изложение основного материала

Для успешного применения ферментного препарата из люцерны необходимо знать, какие химические вещества повышают активность фермента, а какие понижают и могут прекращать его активность. Определяющее значение для фермента имеет скорость ферментативной реакции, которая, как и активность фермента, в значительной степени определяется присутствием в среде активаторов и ингибиторов: первые повышают скорость реакции, а вторые тормозят эту реакцию. Активирующее влияние на скорость ферментативной реакции оказывают разнообразные вещества органической и неорганической природы. В зависимости от природы эффектора, он может выступать как активатором, так и ингибитором определённого фермента [3].

Влияние может осуществляться путём изменения константы Михаэлиса, максимальной скорости реакции или одновременным изменением обоих параметров. Особенно часто активаторами выступают ионы двухвалентных и, реже, одновалентных металлов. Большинство ферментов для проявления полной каталитической активности нуждаются в присутствии металлов. Ионы металлов принимают участие в формировании и стабилизации

активного центра и всей трехмерной структуры молекулы фермента [4].

Немаловажным фактом является также то, что ионы Ca^{2+} повсеместно присутствуют в плодовоовощном сырье, поэтому изучение и характеристика их влияния на поведение разработанного ферментного препарата является обязательной.

Кальций входит в состав растений в количестве 0,2 %. В старых листьях его содержание доходит до 1 %. Поступает в виде иона Ca^{2+} . Роль кальция разнообразна. Кальций, соединяясь с пектиновыми веществами, дает пектаты кальция, которые являются важнейшей составной частью клеточных оболочек растений. Срединные пластинки, склеивающие клеточные оболочки соседних клеток, состоят преимущественно из пектатов кальция [5].

Кальций является активатором таких ферментов, как фосфорилаза, аденозинтрифосфатаза, дегидрогеназы, амилазы и др. Ca^{2+} служит посредником для реакций растений на внешние и гормональные сигналы, входя в состав сигнальных систем [6].

Известно, что полифенолы являются мощным ингибитором пектинметилэстеразы, в силу чего, например, в яблоках, содержащих высокое количество полифенольных соединений, наблюдается слабая активность нативной пектинметилэстеразы, а пектин, содержащийся в яблочном соке, слабо поддается ферментативной деэтерификации.

Наиболее сильный природный ингибитор растительного сырья – пирокатехин. Пирокатехин является двухатомным фенолом, вызывающий окисления углеводов и их производных [7].

Исследование этих ингибиторов и активаторов имеет важное значение, так как дают ценную информацию о химической природе активного центра пектинметилэстеразы, а также о составе его функциональных групп и природе химических связей, обеспечивающих образование фермент-субстратного комплекса.

Таким образом, анализ скоростей ферментативных реакций под действием эффекторов позволит управлять не только кинетикой ферментативных реакций, но и определить молекулярные механизмы ферментативного катализа пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны.

Обсуждение результатов

С целью управления модификацией пектиновых веществ путём регулирования ферментативной активности, а также для возможности использования разработанного ферментного препарата с пектинметилэстеразной активностью в широком спектре технологических операций, моделировали ферментативную деэтерификацию в присутствии эффекторов.

Для характеристики воздействия эффекторов на пектинметилэстеразу ферментного препарата люцерны и субстрат – пектин яблочный (производства корпорации «Herbstreith und Fox», Германия) проводились химические и физико-химические анализы из них: определение массовой доли пектина, водорастворимого и водонерастворимого определяли титриметрическим методом согласно ГОСТ 29059-91 [8]; степень этерификации (СЭ) пектина по ДСТУ 6088:2009 [9]; относительную вязкость пектинового раствора до и после ферментативного катализа определяли с помощью вискозиметра Оствальда диаметром капилляра 0,6 мм; определение активности пектинметилэстеразы по методике [10].

Кинетику ингибирования пирокатехином пектинметилэстеразы разработанного ферментного препарата люцерны изучали в сравнении с кинетикой ингибирования пирокатехином пектинметилэстеразы «Пектофоетидина П20х» (рис. 1).

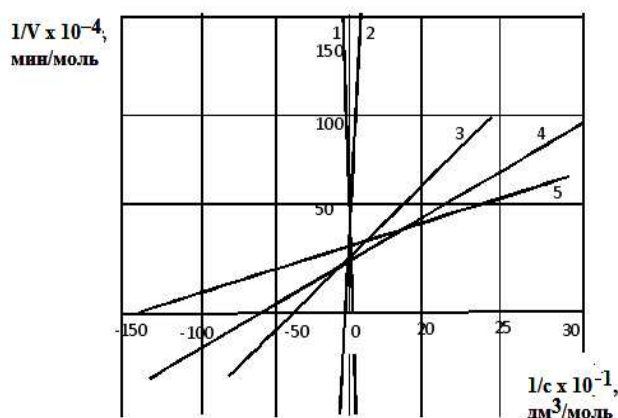


Рис. 1 – Кинетика ингибирования пирокатехином пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны и препарата «Пектофоетидин П20х»: 1 – молярная концентрация пирокатехина 4×10^{-3} М, препарат «Пектофоетидин П20х»; 2 – молярная концентрация пирокатехина 1×10^{-4} М, препарат «Пектофоетидин П20х»; 3 – молярная концентрация пирокатехина 9×10^{-3} М, ферментный препарат люцерны; 4 – молярная концентрация пирокатехина 4×10^{-3} М, ферментный препарат люцерны; 5 – молярная концентрация пирокатехина 1×10^{-4} М, ферментный препарат люцерны

Как следует из представленных данных, при введении в реакцию среду пирокатехина, наблюдали конкурентный тип ингибирования, которое может быть нивелировано увеличением концентрации субстрата. Присутствие пирокатехина увеличивает значение $K_m = 4,5 \times 10^{-4}$ моль/дм³, не оказывая влияния на максимальную скорость по яблочному пектину-субстрату $V_{max} = 2,28 \times 10^{-6}$ моль/с (рис. 2). Это означает, что при достаточно высокой

концентрации субстрата [S] ингибитор вытесняется молекулами субстрата из комплекса фермент-ингибитор.

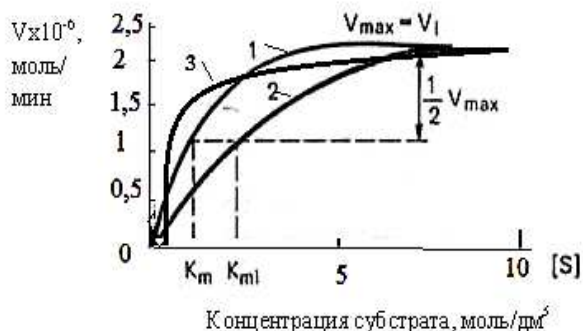


Рис. 2 – Зависимость скорости реакции деэтерификации яблочного пектина под действием пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны и пирокатехина: 1 – молярная концентрация пирокатехина 9×10^{-3} М; 2 – молярная концентрация пирокатехина 4×10^{-3} М; 3 – молярная концентрация пирокатехина 1×10^{-4} М

Как следует из полученных результатов, увеличение концентрации пирокатехина-ингибитора влияет на константу Михаэлиса K_m , при практически одинаковых максимальных скоростях распада интермедиата на продукты реакции. Характерно значительно меньшее воздействие пирокатехина, типичного представителя группы полифенольных соединений, на пектинметилэстеразу ферментного препарата люцерны, чем на пектинметилэстеразу «Пектофоетидина П20х». Возможно, это связано с присутствием в люцерне значительных концентраций полифенольных соединений, как защитных механизмов, противостоящие неблагоприятному воздействию, в том числе, вредителям и фитопатогенным микроорганизмам, и адаптации к ним растительной пектинметилэстеразы. Известным феноменом является потенцирование синтеза микроорганизмом фермента при добавлении в питательную среду субстрата данного фермента, нечто подобное может наблюдаться и в данном случае.

Среди активаторов пектинметилэстеразы наибольший интерес представляют ионы Ca^{2+} , поскольку потенцируя действие этого фермента, они одновременно угнетали действие полигалактуроназы. Взаимодействуя с аллостерическим центром пектинметилэстеразы, ионы Ca^{2+} способствуют образованию наиболее выгодной пространственной конфигурации пектинметилэстеразы и активного фермент-субстратного комплекса.

Анализ данных кинетического эксперимента по изучению влияния ионов Ca^{2+} в координатах Лайнуивера-Берка (рис. 3) позволил установить

неконкурентный тип активирования действия пектинметилэстеразы.

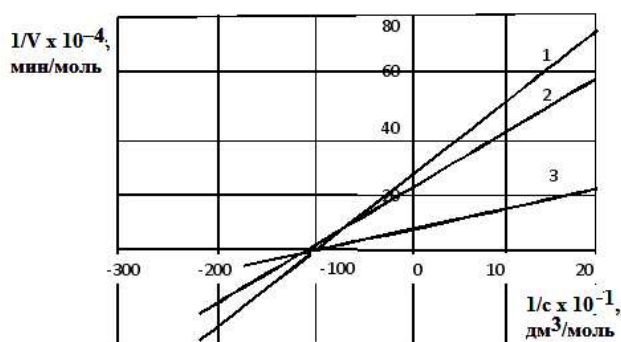


Рис. 3 – Кинетика активации ионами Ca^{2+} пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны: 1 – потенцирование ионами Ca^{2+} с молярной концентрацией $1 \times 10^{-4} \text{ M}$; 2 – потенцирование ионами Ca^{2+} с молярной концентрацией $3 \times 10^{-3} \text{ M}$; 3 – потенцирование ионами Ca^{2+} с молярной концентрацией $6 \times 10^{-3} \text{ M}$

При молярной концентрации ионов кальция $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ активность полигалактуроназы составила 50 % от максимальной. Активирующее влияние ионов Ca^{2+} было более выражено при $\text{pH} = 5,0$, чем при $\text{pH} = 7,0$. Так, при концентрации ионов Ca^{2+} $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ активность пектинметилэстеразы при $\text{pH} 5,0$ возрастала в 3,5 раза (до 2800 Ед/см^3), а при $\text{pH} = 7,0$ – в два раза. В присутствии ионов Ca^{2+} активность пектинметилэстеразы «Пектофоетидина П20х» при $\text{pH} = 5,0$ повышалась до 600 Ед/см^3 .

Проводили процесс дезтерификации пектиновых веществ пектинметилэстеразой ферментного препарата люцерны, в присутствии различных эффекторов – солей кальция. Исследования влияния природы аниона солей кальция на активность фермента проводили путём введения их в состав раствора яблочного пектина, с массовой долей пектина 1 %. Результаты исследований приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Влияние природы соли кальция на кинетику активации пектинметилэстеразы ферментного препарата

Вводимая соль	СЭ, %	pH среды	Консистенция
Яблочный пектин (контроль)	62	4,0	вязкий раствор
Хлорид кальция	38	2,7	синергичный сгусток
Глюконат кальция	38	3,8	прочный гель
Лактат кальция	38	3,7	мягкий гель
Гидрофосфат кальция	38	3,2	синергичный сгусток

Природа вносимой соли оказывает влияние на активность фермента, что следует учитывать при использовании этих солей в процессе модифицирования пектина.

При добавлении солей кальция, ионы металла вступают во взаимодействие с активным центром фермента, ускоряя процесс компактизации полимерной цепи яблочного пектина. Наибольшее активирующее действие оказывают соли кальция: хлорид и гидрофосфат кальция, что следует учитывать при использовании этих солей для получения желеобразных и структурированных продуктов.

Таким образом, механизм регуляции пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны такой: если фермент в неактивном состоянии обозначить – E, то $2 \text{ Ca}^{2+} + \text{E} = (\text{Ca}^{2+})_2\text{E}$, где образуется высокоактивный комплекс фермента.

Как следует из экспериментальных данных, пектинметилэстераза разработанного препарата, в отличие от пектинметилэстеразы микробного происхождения, эффективна для дезтерификации пектина в средах, содержащих как полифенольные соединения, так и соли двухвалентных металлов.

Выводы

Изучено влияние ингибиторов на кинетику реакции дегидроксилирования разработанным ферментным препаратом с пектинметилэстеразной активностью. Установлено, что ингибирование пектинметилэстеразы препарата пирокатехином происходит по неконкурентному типу, что можно нивелировать увеличением концентрации субстрата.

Установлено, что потенцирование активности пектинметилэстеразы разработанного ферментного препарата люцерны возможно путём введения в реакционную смесь ионов Ca^{2+} , анализ данных кинетического эксперимента установил неконкурентный тип активирования действия пектинметилэстеразы.

Таким образом, пектинметилэстераза ферментного препарата люцерны наиболее адаптирована к биосистеме растительного сырья, что свидетельствует о высоких каталитических способностях и способствует созданию альтернативы импортным пектолитическим препаратам, в связи с отсутствием отечественных производственных аналогов.

Список литературы

1. Shady, T. S. Production of pectinolytic enzymes by *Aspergillus foetidus* in solid-state fermentation and its uses for apple juice clarification / T. S. Shady, M. M. Rabie, S. M. Mansour // *Annals Agric. Sci.*, Ain Shams Univ., Cairo. – 46(1). – 2001. – P. 35-50.
2. Will, F. Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases- analytical data of the corresponding juices / F.

- Will, K. Baukhage, H. Dietrich** // *Eur. Food Res. And Technol.* – 2000. – 211. – P. 291-297.
3. **Barnard, A. L.** Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria / **A. L. Barnard, S. D. Bowden, T. Burr, S. J. Coulthurst, R. E. Monson, G. C. Salmond** // *Phil. Trans. R. Soc. B.* – 2007. – Vol. 362. – № 1483. – P. 1165 - 1183. doi:10.1098/rstb.2007.2042.
4. **Bleez, E.** Soubbean Epoxide Hydrolase / **E. Bleez, S. Summerer, M. Flenet, H. Rogniaux, A. Dorselaer** // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – № 8. – P. 6479 - 6487.
5. **Wong, J. H.** The enzymes / **J. H. Wong, T. B. Ng** // *Peptides*. – 2005. – V. 26. – № 4. – P. 2086 - 2092.
6. **Thomma, B. P. H. J.** Plant defensins / **B. P. H. J. Thomma, B. P. A. Cammue, K. Thevissen** // *Planta*. – 2002 – vol. 216. – 2. – P. 193-202.
7. **Витол, И. С.** Ферменты и их применение в пищевой промышленности / **И. С. Витол, И. Б. Корелева** – М.: Издательский комплекс МГУ. – 2000. – 213 с.
8. **Полыга, Г. В.** Определение активности ферментов / **Г. В. Полыга, В. С. Чередниченко, Л. В. Римарева** // Справочник. – М.: ДеЛи принт. – 2003. – 372 с.
9. **ДСТУ 6088: 2009** Пектин. Технічні умови - К.: Держспоживстандарт України. – 2009. – 27 с.
10. **Лисицын А. Б.** Методы биохимического исследования растений / **А. Б. Лисицын, А. Н. Иванкин, А. Д. Неклюдов.** – М.: Издательство ВНИИМП. – 2002. – 408 с.
2. **Will, F., Baukhage, K., Dietrich, H.** Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases- analytical data of the corresponding juices. *Eur. Food Res. And Technol.*, 2000, **211**, 291-297.
3. **Barnard, A. L., Bowden, S. D., Burr, T., Coulthurst, S. J., Monson, R. E., Salmond, G. C.** Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 2007, Vol. 362, **1483**, 1165 - 1183, doi:10.1098/rstb.2007.2042.
4. **Bleez, E., Summerer, S., Flenet, M., Rogniaux, H., Dorselaer, A.,** Soubbean Epoxide Hydrolase. *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**(8), 6479 - 6487.
5. **Wong, J. H., Ng, T. B.** The enzymes. *Peptides*, 2005, **26**(4), 2086-2092.
6. **Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. A., Thevissen, K.** Plant defensins, *Planta*, 2002, **216**(2), 193-202.
7. **Vitol, J. S., Koreleva, I. B.** Fermenty i ikh primenenie v pishchevoy promyshlennosti [Enzymes and their use in the food industry]. Moscow: Publishing Complex of MGU, 2000, 213 p.
8. **Polygalina, G. V., Cherednichenko B. C., Rimareva L. V.** Opredelenie aktivnosti fermentov [Determination of enzyme activity]. Spravochnik, Moskov: DeLi print, 2003, 372 p.
9. **DSTU 6088: 2009** Pektin. Tehnichni umovi [DSTU 6088: 2009 Pectin. Specifications], Kyiv: Derzhspozhivstandart Ukraini, 2009, 27 p.
10. **Lisicyn A. B., Ivankin A. N., Nekljudov A. D.** Metody biokhimicheskogo issledovaniya rasteniy [Methods of biochemical plant research]. Moscow: Izdatel'stvo VNIIMP, 2002, 408 p.

Bibliography (transliterated)

Сведения об авторах (About authors)

Безусов Анатолий Тимофеевич – доктор технических наук, профессор кафедры Биотехнологии, консервированных продуктов и напитков; Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса, Украина; e-mail: alex-n@te.net.ua

Bezysov Anatoliy – Doctor of Technical Sciences, Full Professor, Professor of the Department of Biotechnology, canned foods and beverages, Odesa national academy of food technologies, Odesa, Ukraine; e-mail: alex-n@te.net.ua

Никитчина Татьяна Ивановна – кандидат технических наук, доцент, кафедра Биотехнологии, консервированных продуктов и напитков, Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса; e-mail: nikitchinati@ukr.net

Nikitchina Tatiyna – Candidate of Technical Sciences (Ph. D.), Docent of the Department of Biotechnology, canned foods and beverages, Odesa national academy of food technologies, Odesa, Ukraine; e-mail: nikitchinati@ukr.net

Пожалуйста ссылайтесь на эту статью следующим образом:

Безусов, А. Т. Влияние эффекторов пектинметилэстеразы люцерны на кинетику деэтерификации пектиновых веществ / **А. Т. Безусов, Т. И. Никитчина** // *Вестник НТУ «ХПИ»*, Серия: Новые решения в современных технологиях. – Харьков: НТУ «ХПИ». – 2016. – № 12 (1184). – С. 145-149. – doi:10.20998/2413-4295.2016.12.21.

Please cite this article as:

Bezysov, A., Nikitchina, T. Influence of effectors pectin methylesterase alfalfa deesterification kinetics of pectin substances. *Bulletin of NTU "KhPI". Series: New solutions in modern technologies.* – Kharkiv: NTU "KhPI", 2016, **12** (1184), 145-149, doi:10.20998/2413-4295.2016.12.21.

Будь ласка посилайтесь на цю статтю наступним чином:

Безусов, А. Т. Вплив ефекторів пектинметилестерази люцерни на кінетику деестерифікації пектинових речовин / **А. Т. Безусов, Т. І. Нікітчина** // *Вісник НТУ «ХПІ»*, Серія: Нові рішення в сучасних технологіях. – Харків: НТУ «ХПІ». – 2016. – № 12 (1184). – С. 145-149. – doi:10.20998/2413-4295.2016.12.21.

АНОТАЦІЯ Досліджено можливості регулювання ферментативної активності і використання пектинметилестерази ферментного препарату люцерни для деестерифікації яблучного пектину, з використанням моделювання ферментативної реакції в присутності ефекторів. Проведена експериментальна оцінка представників активаторів і інгібіторів пектинметилестерази ферментного препарату люцерни. Встановлено вплив ефекторів шляхом зміни константи Міхаеліса та максимальної швидкості реакції в результаті взаємодії активаторів і інгібіторів пектинметилестерази ферментного препарату люцерни, як з вільною формою ферменту, так і з фермент-субстратним комплексом.

Ключові слова: яблучний пектин, фермент, пектинметилестераза, пірокатехін, іони кальцію, люцерна, швидкість реакції.

Поступила (received) 15.03.2016